

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INPIINSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

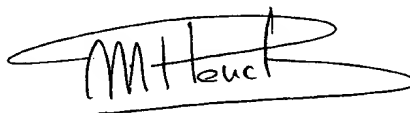
PCT/FR 00 / 00427

REC'D 13 MAR 2000

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****DOCUMENT DE PRIORITÉ****COPIE OFFICIELLE**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **28 JAN. 2000**Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets**Martine PLANCHE****INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE****SIEGE**26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **22 FEV 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9902170**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **22 FEV. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BREVATOME
3, rue du Docteur Lancereaux
75008 PARIS
422-5/S002

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☒ demande initiale
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent 07068 du 12.06.98
références du correspondant B 13231.3/MDT 01 53 83 94 00
téléphone 00 1886
date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE DE FABRICATION DE MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, ET UTILISATION DE CEUX-CI POUR L'ANALYSE ET LE MARQUAGE DE SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Etablissement de Caractère Scientifique,
Technique et Industriel

Nationalité (s)

Adresse (s) complète(s) **Française**

Pays

31, 33 rue de la Fédération 75015 PARIS

France

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

M. DES TERMES (422-5/S002)

N. de Termes

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Pm

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg B 13231.3/MDT
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9902170

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE DE FABRICATION DE MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, ET
UTILISATION DE CEUX-CI POUR L'ANALYSE ET LE MARQUAGE DE
SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

M. DES TERMES
c/o BREVATOME
25 rue de Ponthieu
75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

Florence MARCIACQ

6, rue Gambetta
13580 La FARE les OLIVIERS

Sylvie SAUVAIGO

Le Noyaret
38320 HERBEYS

MOURET Jean-François

Montée du Pilet
38500 COUBLEVIE

ISSARTEL Jean-Paul

9 rue du Fournet
38120 SAINT-EGREVE

MOLKO Didier

Les Noyers A1.1
11, avenue de la gare
38210 TULLINS

FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS LE 22 FEVRIER 1999.


M. DES TERMES
422-5/S002

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p 14, 15, 20				2/8/99	J P M - 04 AOUT 1999,
p 14				16/8/99	J P M - 19 AOUT 1999

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

PROCEDE DE FABRICATION DE MORPHOLINO-NUCLEOTIDES, ET
UTILISATION DE CEUX-CI POUR L'ANALYSE ET LE MARQUAGE DE
SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES.

DESCRIPTION

5 **Domaine technique**

La présente invention a pour objet la fabrication de fragments d'acides nucléiques (ADN ou ARN) allongés enzymatiquement au moyen de morpholino-nucléosides triphosphates. Cette élongation peut être
10 utilisée pour l'analyse de séquences d'acides nucléiques par incorporation de ces dérivés dans des chaînes d'acides nucléiques ainsi que le marquage enzymatique et l'immobilisation ou la détection de séquences.

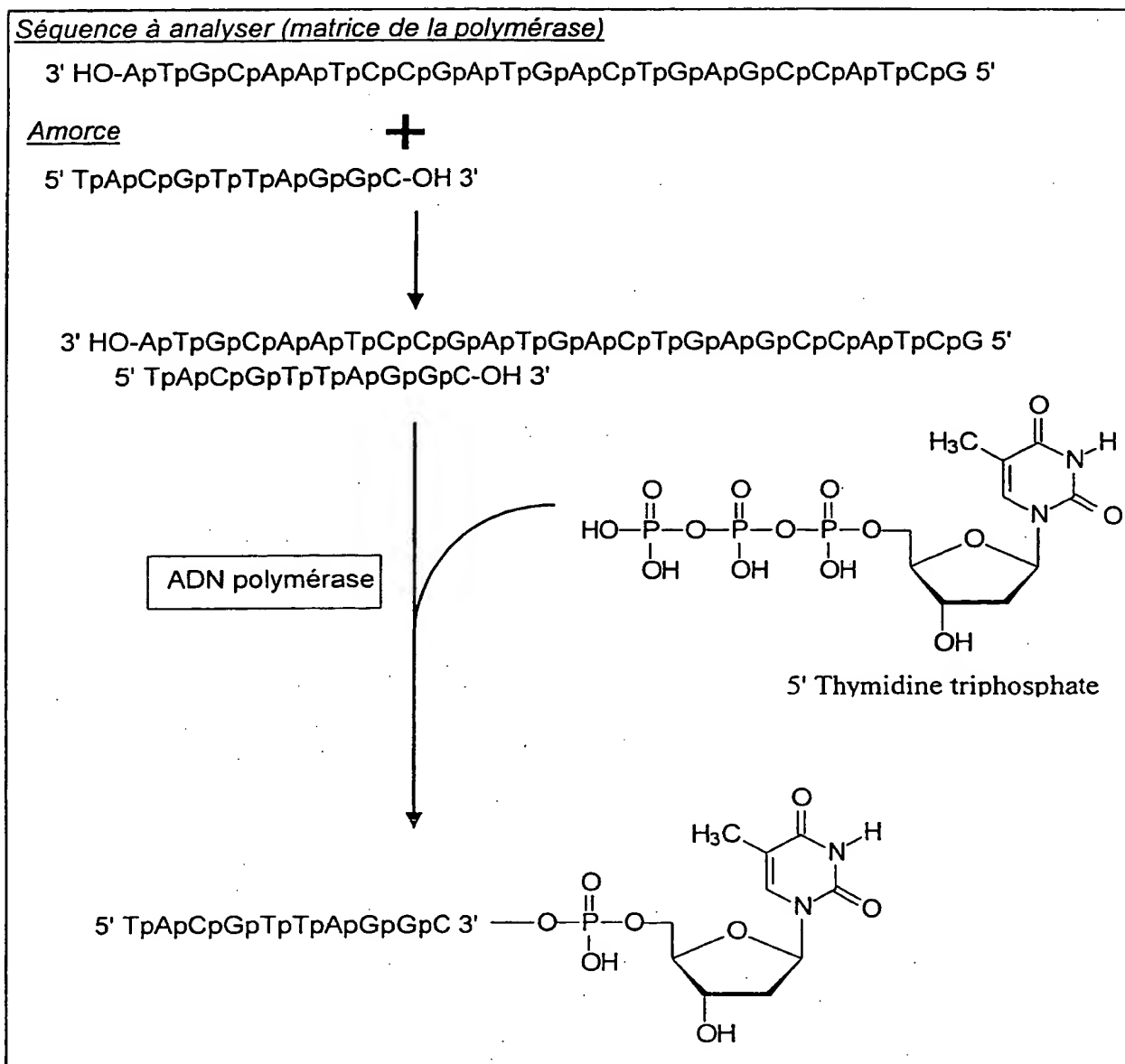
Ces morpholino-nucléosides triphosphates
15 peuvent encore être utilisés avec une molécule supplémentaire pouvant jouer divers rôles dans de nombreuses applications.

État de la technique antérieure

La méthode la plus répandue pour analyser les
20 séquences des acides nucléiques est la technique enzymatique dite de terminaison de chaîne, développée par Sanger et al dans Proceedings of National Academy of Science, 74, 1977, p. 5463-5467 [1]. Elle repose sur les propriétés qu'ont les ADN polymérases-ADN dépendantes de
25 créer des polymères d'ADN complémentaires de la séquence d'un brin d'ADN servant de matrice, à partir d'un mélange de monomères de nucléosides triphosphates naturels. Le

procédé consiste, à partir du brin d'ADN à analyser, à faire une série d'exemplaires du brin complémentaire en ajoutant au milieu réactionnel classique des molécules appelées « terminateurs de chaînes », puis à analyser la longueur des brins néoformés pour déterminer la séquence des bases de la matrice. Le principe de la méthode est expliqué dans le tableau 1 qui suit.

Tableau 1



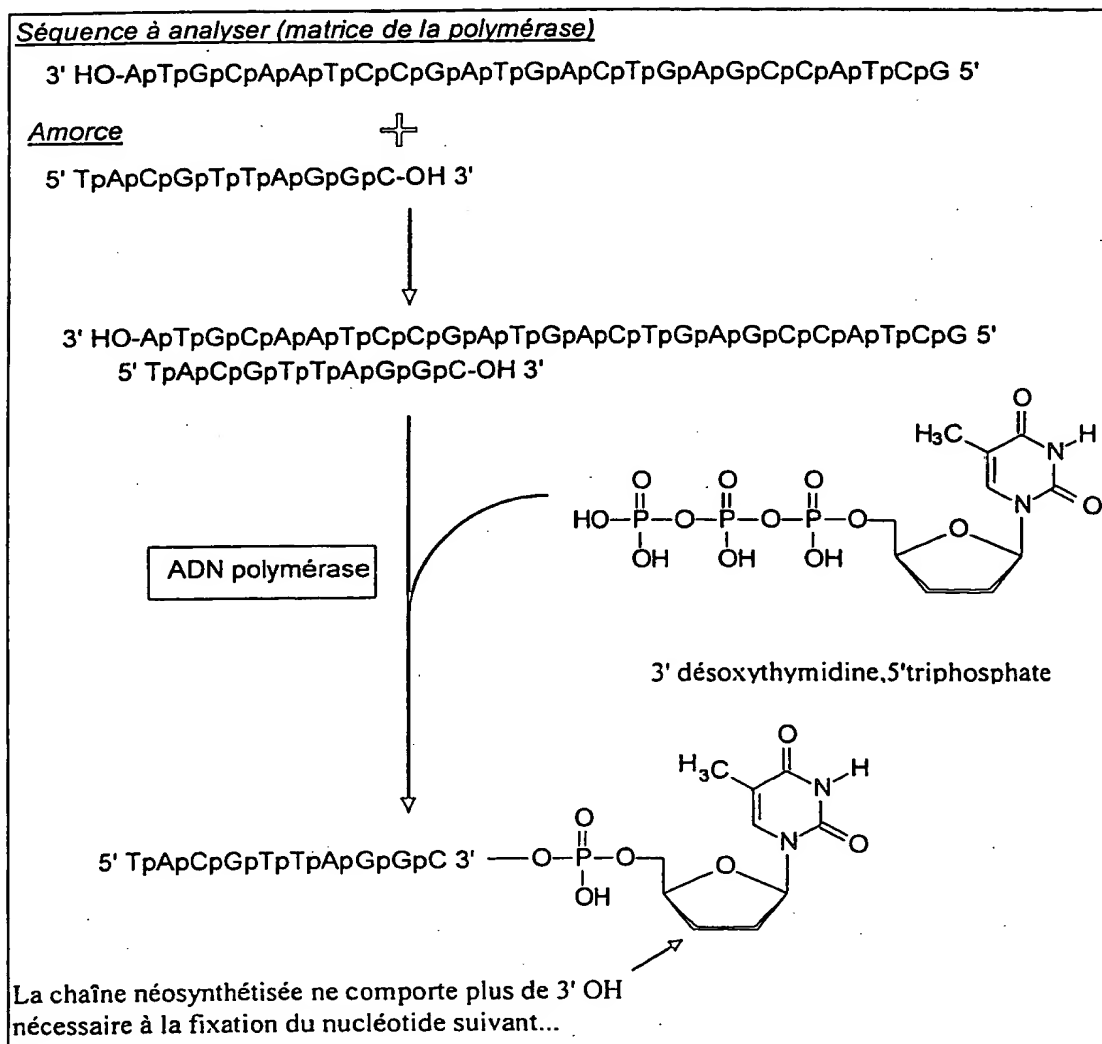
Ce tableau 1 illustre ce qui se produit lorsque l'on met en présence l'ADN polymérase, une amorce constituée par un oligonucléotide de taille réduite, généralement inférieure à 25 bases, et le mélange des quatre nucléosides triphosphates naturels avec le brin d'ADN dont on veut déterminer la séquence, qui constitue la matrice. L'amorce correspond au début de la séquence complémentaire du brin d'ADN à analyser. A partir de cette amorce, qui spontanément entre en interaction avec la séquence complémentaire du brin d'ADN à analyser (hybridation), l'enzyme incorpore des nucléotides complémentaires de la matrice pour construire par élongation-polymérisation un nouveau brin d'ADN, copie complémentaire de cette dernière. Les nouveaux nucléotides sont incorporés exclusivement à partir de l'extrémité 3'-OH terminale de la chaîne en croissance, de manière séquentielle et en respectant les règles de complémentarité entre bases de Watson & Crick. Une thymine est incorporée dans le brin néoformé par complémentarité avec une adénine présente dans le brin servant la matrice, une guanine est incorporée en complémentarité d'une cytosine et réciproquement. Si tous les composés nécessaires sont fournis en quantité non-limitante, l'enzyme catalyse la polymérisation du brin formé jusqu'à ce que ce dernier représente la totalité du brin complémentaire parfait de la matrice.

Par contre, si l'on rajoute au milieu réactionnel une molécule qui est reconnue par la polymérase mais qui ne présente pas d'extrémité 3'-OH terminale libre, chaque fois que cette molécule sera incorporée, le travail de polymérisation de l'enzyme sera interrompu parce que la chaîne ne pourra plus croître à cause de l'absence de site disponible pour ancrer un

nouveau nucléotide (création de brins néoformés interrompus). C'est ce qui est illustré dans le tableau 2 qui suit avec la 3'désoxythymidine, 5'-triphosphate.

5

Tableau 2



- 10 En utilisant ce dérivé de thymidine que l'on appellera « terminateur de chaîne T » à une concentration adéquate, on obtient pour une matrice donnée, une série de brins d'ADN dont la taille est fixée statistiquement par la position des adénines de la matrice. Le résultat

obtenu est illustré dans le tableau 3. La séquence de la matrice est écrite dans la première ligne, la séquence des brins néoformés créés avec le terminateur de chaîne T (noté S) est écrite dans les lignes suivantes.

5

Tableau 3

MATRICE

3'- A T G C A T T C C G A C C T C T G A T C A G -5'

COPIES DE LA MATRICE

5'- S

5'- T A C G S

5'- T A C G T A A G G C S

5'- T A C G T A A G G C T G G A G A C S

5'- T A C G T A A G G C T G G A G A C T A G S

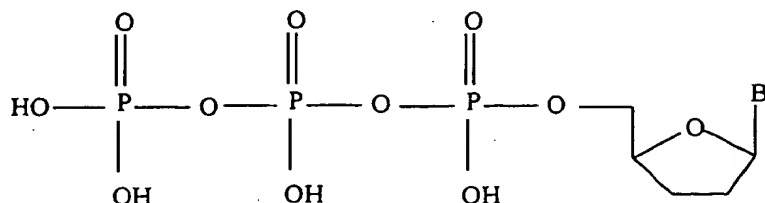
Dans cet exemple, la matrice comporte 5 adénines dans la zone qui est détaillée, l'ADN polymérase pourra donc produire 5 brins néoformés interrompus, de longueurs différentes.

Il suffit ensuite d'analyser ce mélange par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant pour déterminer la longueur de chacun des brins obtenus en utilisant le terminateur de chaîne T. La taille des brins néoformés interrompus permet de déduire la position des adénines sur la matrice.

En recommençant trois fois cette expérience avec respectivement des produits terminateurs de chaînes A, G et C, on obtient au total quatre séries de fragments d'ADN dont la longueur permet de déterminer la séquence entière du brin matrice.

La technologie du séquençage des ARN repose sur les mêmes principes, la différence étant que l'enzyme employée est une transcriptase inverse (ou ADN polymérase-ARN dépendante).

Les produits les plus utilisés comme terminateurs de chaîne pour arrêter l'action des ADN polymérases sont des 2',3'-didésoxynucléosides triphosphates de formule :



5

dans laquelle B représente l'une des bases nucléiques A, C, G ou T, comme il est décrit dans le document [1].

La structure de ces produits comparée à celle des nucléosides triphosphates naturels montre l'absence de la fonction hydroxyle en position 3' qui sert de position d'attache du nucléotide suivant.

La synthèse chimique des 2',3'-didésoxy-nucléotides est réalisée selon un protocole long et fastidieux comportant trois grandes étapes. Dans le cas de la guanine, la première étape de ce processus est la protection de la fonction amine exocyclique de la guanine et de la fonction hydroxyle primaire en 5' du sucre. On réalise ensuite la suppression de la fonction hydroxyle en 3', par élimination puis par réduction de la double liaison 2'-3' générée. La dernière étape est la préparation du dérivé triphosphate.

D'autres terminateurs de chaîne ont été décrits dans le document WO-A-96/23807 [2]. Ce sont les 5'-triphosphates des arabinonucléosides, des 3'-fluoro-2',3'-didésoxynucléosides, les 3'-azido-2',3'-didésoxynucléosides ou les 3'-amino-2',3'-didésoxy-nucléosides. Leur synthèse est tout aussi laborieuse.

A l'origine de la méthode de Sanger, la visualisation des fragments d'ADN synthétisés se faisait par marquage radioactif au ^{32}P en 5' de l'amorce utilisée pour initier la polymérisation du brin complémentaire.

5 Une modification a été apportée en utilisant des amorces porteuses d'un fluorophore. Cette amélioration porte uniquement sur la facilité d'emploi, puisqu'elle supprime l'utilisation de matières radioactives, mais il faut toujours réaliser quatre réactions de séquençage, chacune
10 utilisant un terminateur de polymérisation différent (terminateur A, G, T ou C).

Un nouveau pas a été franchi avec l'emploi de terminateurs de séquences porteurs de fluorophores sur leur base nucléique, comme il est décrit par Prober et
15 al, dans Science, 238, 1987, pages 336-341 [3].

Dans ces conditions, le marquage des brins néo-synthétisés n'est plus fait avant la réaction de séquençage, mais directement au moment de l'incorporation du terminateur de séquence. En prenant soin de choisir un
20 fluorophore présentant des propriétés optiques différentes pour chaque base de l'ADN, le protocole expérimental a été très fortement simplifié. On ne pratique plus qu'une seule réaction avec les quatre terminateurs en mélange. De ce fait, à partir d'un unique
25 canal d'électrophorèse, on distingue les quatre nucléotides de la séquence grâce aux longueurs d'ondes d'émission différentes des quatre terminateurs.

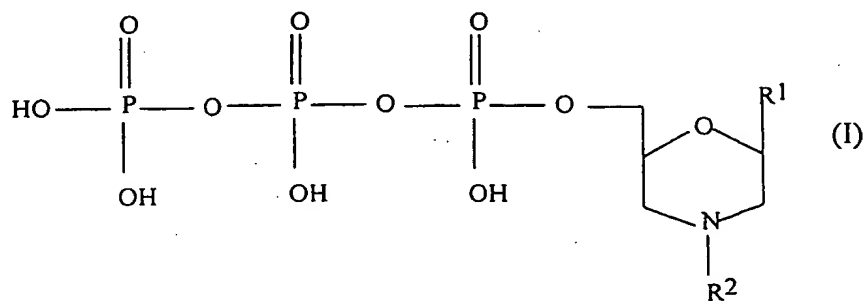
Cette simplification dans le protocole d'analyse n'a pas que des avantages. En effet, les
30 fluorophores sont greffés directement sur la base. Cette modification structurale, localisée au voisinage direct des sites de liaisons hydrogène régissant la reconnaissance entre les bases, entraîne une diminution

de la reconnaissance par les enzymes. Pour compenser cela, une augmentation de la concentration des terminateurs est préconisée, qui conduit à une très grande consommation de la matière première ayant une très forte valeur ajoutée. De plus, la synthèse de ces molécules est toujours aussi délicate.

Exposé de l'invention

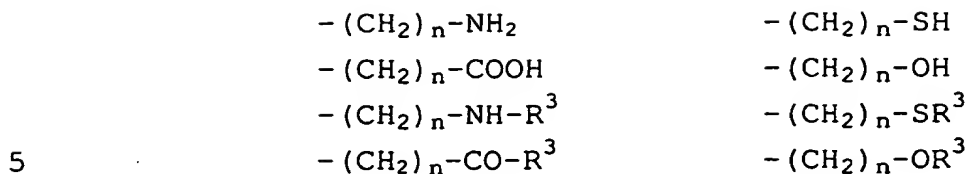
La présente invention a notamment pour objet l'utilisation, dans un procédé de séquençage de ce type, de terminateurs de chaînes constitués par des analogues de nucléosides triphosphates plus facile à synthétiser, qui permettent de plus de réaliser un marquage efficace sans modifier les bases nucléiques.

Aussi, l'invention a pour objet un procédé de séquençage d'un acide nucléique (ADN ou ARN) par la technique de polymérisation enzymatique de la séquence complémentaire de cet acide nucléique en utilisant des terminateurs de chaînes, dans lequel au moins l'un des terminateurs de chaînes a pour précurseur un composé répondant à la formule :



dans laquelle R^1 représente une base nucléique et R^2 représente un groupe répondant à l'une des formules

suivantes :



dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R^3 est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide.

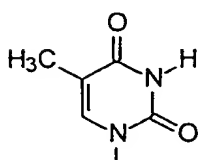
10 Les terminateurs de chaînes utilisés dans ce procédé sont des dérivés de nucléotides comportant une base nucléique R^1 qui permet la reconnaissance par les polymérases et les transcriptases, et le respect des règles de complémentarités de Watson et Crick.

15 Les bases nucléiques utilisées pour R^1 peuvent être naturelles ou synthétiques. Les bases naturelles sont généralement choisies parmi l'adénine, la guanine, la cytosine, la thymine, l'uracile, la xanthine, l'hypoxanthine, la 2-aminopurine et leurs dérivés.

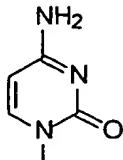
20 Les bases synthétiques sont des analogues ou des dérivés des bases nucléiques naturelles, qui sont capables d'interagir avec les bases naturelles.

De préférence, R^1 répond à l'une des formules suivantes :

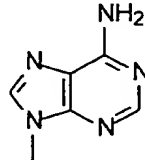
25



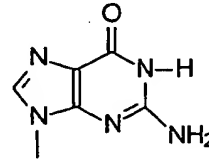
T



C



A



G

Dans les dérivés nucléotides de formule (I), la partie osidique est remplacée par une morpholine convenablement substituée comportant :

1°) Une fonction hydroxyméthyle voisine de l'oxygène cyclique, estérifiée par un groupement acide triphosphorique. Cette partie de la molécule mime la partie 4', 5' des nucléotides et permet la fixation par la polymérase ou la transcriptase à la chaîne d'ADN ou d'ARN en croissance.

2°) Une fonction amine substituée par R₂, qui peut éventuellement permettre le greffage d'un chromophore ou d'un groupe biologiquement actif et surtout, qui interdit l'attachement d'un autre nucléotide (interruption de la polymérisation).

Par rapport aux dérivés classiquement utilisés dans la méthode de Sanger tels que ceux décrits dans les document [1], [2] et [3], ces composés peuvent être synthétisés en une seule étape directement à partir des ribonucléosides triphosphates, comme on le verra ci-après.

L'intérêt de ces composés réside dans le très grand choix de groupes R² (substituants du cycle morpholine) utilisables qui permettent de fonctionnaliser ce cycle. Des fonctions telles que des acides, amines, thiols ou éthers peuvent être ajoutées et permettront le greffage de composés chimiques variés, notamment de marqueurs utiles pour l'identification des fragments d'ADN ou d'ARN.

Les marqueurs utilisés pour R³ peuvent être choisis dans un ensemble très vaste de molécules connues pour le marquage de nucléotides. Ils peuvent être choisis par exemple parmi les produits radioactifs, les produits luminescents, électroluminescents et fluorescents, les

molécules capables de se coupler à d'autres molécules, les molécules autorisant des interactions de type antigène-anticorps, et les marqueurs enzymatiques.

De préférence, pour le séquençage des acides nucléiques, R^3 est un fluorophore, par exemple, choisi parmi tous les dérivés de la fluorescéine ou de la rhodamine. On peut aussi utiliser ceux de la biotine. En particulier, seront choisis ceux des dérivés utilisés pour le marquage des acides nucléiques.

Des dérivés de nucléosides dans lesquels la partie osidique du nucléoside a été remplacée par une morpholine, ont déjà été synthétisés dans l'art antérieur, comme il apparaît dans les documents suivants :

- Hileman et al, Bioconjugate Chemistry, 5, 1994, pages 436-444 [4],
- Broker et al, Nucleic Acids Research, 5, 1978, pages 363-385 [5],
- Agrawal et al, Nucleic Acids Research, 14, 1986, pages 6227-6245 [6],
- FR-A- 2 710 068 [7], et
- Rayford et al, Journal of Biological Chemistry, 260, 1985, pages 15708-15713, [8].

Les dérivés de nucléosides du document [4] comportent un cycle morpholino qui est substitué par une fluorescéine ou une rhodamine. Ils sont utilisés pour l'étude de protéines et non comme terminateurs de chaîne dans un procédé de séquençage d'acides nucléiques.

Leur fabrication diffère du processus que nous rapportons, car le fluorophore est incorporé directement sur le cycle morpholine. La technique que nous décrivons fait appel à une étape de purification intermédiaire qui

nous a permis d'isoler et de parfaitement caractériser le produit final, au contraire de Hileman et al.

Dans le document [5], il s'agit d'ARN de transfert modifié à son extrémité 3' par un dérivé de
5 nucléoside comportant un cycle morpholine substitué par une biotine. Ce produit est utilisé comme marqueur chimique des ARN de transfert pour étudier la localisation chromosomique des gènes des ARN de transfert.

10 Dans le document [6], il s'agit d'un oligonucléotide comportant un cycle morpholine couplé à une biotine, qui est utilisé comme sonde pour la détection et l'isolement de gènes spécifiques.

Le document [7] décrit des dérivés de
15 nucléosides comportant un cycle morpholine substitué. Ils sont utilisés pour la préparation d'anticorps dirigés contre un haptène fixé au cycle morpholine du dérivé de nucléoside.

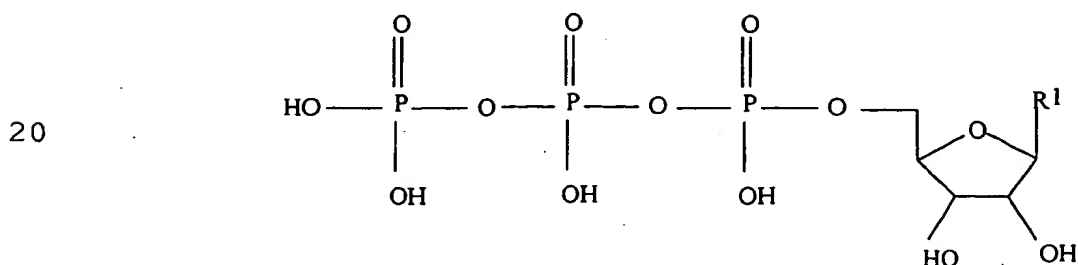
Le document [8] illustre une
20 morpholinoadénosine substituée par CH_2COOH , utilisée pour la chromatographie d'affinité.

Ainsi, aucun de ces documents ne concerne l'utilisation de dérivés de nucléotides tels que ceux de l'invention, comme terminateurs de chaînes, dans un
25 procédé de séquençage d'acides nucléiques selon la méthode de Sanger.

Les dérivés de nucléotides utilisés dans le procédé de l'invention, peuvent être préparés en une seule étape, directement à partir des ribonucléosides
30 triphosphates selon le schéma réactionnel suivant illustré avec R^1 représentant l'adénine.

On peut aussi préparer les dérivés de nucléotides de formule (I) à partir des morpholino-nucléosides et introduire ensuite le groupe triphosphate en utilisant le protocole d'Eckstein, comme il est décrit par Ludwig et al dans J. Org. Chem. 54, 1989, pages 631-635 [9].

Selon l'invention, le procédé de préparation
15 de morpholino-nucléotides de formule (I) comprend la
réaction d'un nucléoside triphosphate de formule :



25 dans laquelle R^1 a la signification donnée ci-dessus, avec un periodate, un composé de formule $R^2 NH_2$ dans laquelle R^2 a la signification donnée ci-dessus et du borohydrure de sodium.

L'invention concerne également l'utilisation des morpholino-nucléotides de formule (I) pour le marquage en 3' de fragments d'acide nucléique (ADN ou ARN) par incorporation enzymatique d'un morpholino-nucléotide de formule (I) à l'extrémité 3'OH du fragment.

L'enzyme utilisée peut être le fragment de Klenow de l'ADN polymérase, et on utilise alors une matrice ou template pour fixer le morpholino-nucléoside sur le fragment d'acide nucléique qui sert d'amorce.

L'enzyme utilisée peut aussi être une polymérase thermorésistante d'une bactérie thermophile ou la terminal transférase ou la transcriptase inverse.

Les fragments d'ADN ou d'ARN ainsi marqués sont utilisables pour bloquer toute ligation ultérieure et assurer une protection contre les exonucléases, ainsi que pour détecter des fragments d'ADN ou d'ARN.

On peut encore utiliser les morpholino-nucléotides de formule (I) pour modifier un fragment d'ADN ou d'ARN en incluant à l'extrémité 3' de celui-ci un morpholino-nucléotide de l'invention comprenant en R³ un composé choisi parmi les photoréticulants par exemple pour réticulation sur ADN ou sur un support quelconque ; les acides gras, les peptides hydrophobes et les anticorps par exemple pour faciliter la pénétration dans les cellules ; et les enzymes ou parties d'enzymes telles que les phosphatases alcalines, les peroxydases, les acétylcholinestérases pour la détection, et les enzymes de restriction pour le clivage de l'ADN vicinal.

Comme précédemment l'incorporation de ce morpholino-nucléotide modifié est effectuée par voie enzymatique. Les bases azotées, les marqueurs et les enzymes utilisables peuvent être les mêmes que ceux précités.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit d'exemples de réalisation, donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en
5 référence au dessin annexé.

Brève description des figures

La figure 1 est un diagramme illustrant les résultats obtenus pour le séquençage d'ADN plasmidique avec le terminateur de chaîne de l'invention (courbe en
10 trait plein) et avec le terminateur de chaîne de l'art antérieur (courbe en tirets).

La figure 2 est un diagramme illustrant les résultats obtenus en testant les morpholino A putrescine (MATPP) et morpholino A fluorescéine (MATPPF) en
15 séquençage.

La figure 3 est un schéma illustrant le résultat sur gel de polyacrylamide d'un test permettant de suivre l'allongement d'un oligonucléotide A et l'incorporation de morpholino A putrescine.

20 Exposé détaillé des modes de réalisation

Les exemples 1 à 4 qui suivent, illustrent la synthèse de morpholino-nucléotides de formule (I).

Exemple 1 : Synthèse de la 4-(carboxyméthyl)-2-(adénosin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl)morpholine-6-triphosphate (morpholino A glycine).

Cette morpholino A glycine répond à la formule
5 (I) dans laquelle R^1 est l'adénine et R^2 est le groupe $-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

Dans cet exemple, toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 50 mL.

10 On dissout 1,000 g, (1,8 mmol, 1 éq.) de 5'-adénosine triphosphate dans 10 mL d'eau, puis on ajoute 1 éq. de periodate de sodium (388 mg, 1,8 mmol). La solution est alors agitée pendant 35 minutes.

La glycine (682 mg, 9,1 mmol, 5 éq.) en
15 solution dans 2 mL d'eau (pH = 9,5-10) est ajoutée et l'on remonte le pH de la solution à 9,5-10 avec du carbonate de potassium solide. La solution est agitée pendant 55 minutes. Le mélange réactionnel jaunit.

Du borohydrure de sodium (au total 166 mg,
20 4,4 mmol, 2,5 éq.) est ajouté en six fractions équivalentes, chacune dissoute dans 0,2 mL d'eau. Après ajout de la première, on note un dégagement gazeux. Les autres fractions, chacune dissoute juste avant ajout, sont additionnées toutes les heures.

25 Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH 4-5, puis elle est évaporée.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur une colonne Merck LiChrocart 125-4
30 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5 μm , 125x4 mm) en utilisant un débit de 1 mL/min et l'éluant acétate de

triéthylammonium TEAA 25mM/méthanol MeOH [98/2], indique un rendement de 40 % ($k' = 3,85$).

Purification : elle est faite par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative en utilisant une colonne Macherey Nagel Nucléosil 7 C-18 7 μ m, 250x21 mm) avec un débit de 8 mL/min et du bicarbonate de triéthylammonium TEAB 25mM, comme éluant.

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 8,47 (s, 1H, H2), 8,37 (s, 1H, H8), 6,26 (dd, 1H, H1'), 4,54 (m, 1H, H4'), 4,28 (m, 1H, H5''), 4,22 (m, 1H, H5'), 3,70 (m, 1H, H2'), 3,68 (s, 2H, CH₂-Glycine), 3,41 (m, 1H, H2''), 3,45 (m, 1H, H3'), 3,30 (m, 1H, H3''),

- RMN ^{13}C : δ (ppm) : 152,7 (C2), 140,5 (C8), 78,6 (C1'), 74,1 (C4'), 66,4 (C5'), 60,6 (CH₂), 54,5 (C2'), 53,6 (C3')

- RMN ^{31}P : δ (ppm) : -6,44 (d, 1P, γP), -11,68 (d, 1P, αP), -22,11 (t, 1P, βP)

- Spectrométrie de masse : $\text{MH}^- = 547,04 \text{ g.mol}^{-1}$

Les trois autres morpholino-nucléotides avec R¹ représentant la thymine, la guanine et la cytosine peuvent être synthétisés de manière analogue.

Exemple 2 : Synthèse de la 4-(aminobutyl)-2-(adénosin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl)morpholine-6-triphosphate (morpholino A putrescine).

Cette morpholino A putrescine répond à la formule (I) avec R¹ représentant l'adénine et R² représentant le groupe $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$.

Toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 100 mL.

La 5'-adénosine triphosphate (500 mg, 0,9 mmol, 1 éq.) est dissoute dans 10 mL d'eau, puis est additionnée de 1 éq. de periodate de sodium (194 mg, 0,9 mmol). La solution est alors agitée pendant 45 minutes.

La putrescine (456µL, 4,5 mmol, 5 éq.) est ajoutée. La solution est agitée pendant 45 minutes. Le mélange réactionnel jaunit.

Un sixième de borohydrure de sodium (au total 86 mg, 2,3 mmol, 2,5 éq.) dissous dans 0,1 mL d'eau est ajouté à la solution. On note un dégagement gazeux. Les autres sixièmes, chacun dissous juste avant ajout, sont additionnés toutes les heures.

Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH4-5, puis elle est évaporée.

On effectue une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur colonne Merck LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5 µm, 125x4mm) avec un débit de 1 mL/min, en utilisant comme éluant un gradient TEAB 25mM/MeOH, dans les conditions suivantes :

25

t(min)	TEAB (%)	MeOH (%)
0	97	3
2	97	3
10	90	10
15	90	10
17	97	3

Cette analyse indique un rendement de 67% ($k'=3,81$).

On purifie le produit par HPLC semi-préparative sur la colonne Phenomenex Ultremex 5-C18 (250x10 mm) avec un débit de 4 mL/min, et en utilisant comme éluant un gradient TEAB 25 mM/MeOH, dans les conditions suivantes :

t(min)	TEAB (%)	MeOH (%)
0	95	5
3	95	5
8	90	10
10	95	5

Caractérisation :

10 - RMN ^1H : δ (ppm) : 8,44 (s, 1H, H2), 8,33 (s, 1H, H8), 6,06 (dd, 1H, H1'), 4,35 (m, 1H, H4'), 4,22 (m, 2H, H5', H5''), 3,39 (d, 1H, H2'), 3,22 (t, 1H, H3''), 3,14 (s, 2H, CH₂ putrescine), 2,92 (t, 1H, H2'), 2,74 (s, 2H, CH₂ putrescine), 2,54 (t, 1H, H3'), 1,78 (s, 4H, (CH₂)₂ putrescine).

- RMN ^{31}P : δ (ppm) : -8,45 (dd, 1P, γP), -13,25 (dd, 1P, αP), -24,20 (t, 1P, βP)

- Spectrométrie de masse : $\text{MH}^+ = 561,92 \text{ g.mol}^{-1}$

Exemple 3 : Synthèse de la 4-[5((2-aminobutyl)-thiouréidyl)fluorescein)]-2-(adénosin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl)-morpholine-6-triphosphate (morpholino A putrescine-fluorescéine).

5 Ce composé répond à la formule (I) avec R^1 représentant l'adénine, et R^2 représentant $(CH_2)_4NHR^3$ où R^3 est la fluorescéine.

Toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un
10 ballon de 100 mL.

On ajoute en trois fois et progressivement à 200 mg (0,3 mmol, 1 éq.) de la Morpholino A putrescine de l'exemple 2, dans un mélange eau/pyridine (1/1), 184,9 mg (0,5 mmol, 1,5 éq.) de fluorescéine isothiocyanate. Le
15 milieu est agité pendant 48 heures avant d'être évaporé à sec.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur la colonne Merck LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5 μ m, 125x4 mm), avec
20 un débit de 1 mL/min en utilisant comme éluant : TEAA 25mM/MeOH [97/3], indique un rendement d'environ 48% ($k'=7,51$).

Purification : elle est faite par chromatographie "flash"
25 sur une colonne de silice à polarité de phase inversée C-18 (Econosil prep 90, Alltech, France). L'éluant est un gradient eau/MeOH.

Caractérisation :

30 - RMN 1H : δ (ppm) : 8,57 (s, 1H, H2), 8,31 (s, 1H, H8), 8,20-6,65 (9H, fluorescéine), 5,79 (dd, 1H, H1'), 4,25 (m, 1H, H4'), 4,11 (m, 2H, H5', H5''), 3,60 (s,

2H, CH₂ putrescine), 3,12 (d, 1H, H3''), 2,93 (d, 1H, H2''), 2,81 (m, 1H, H2'), 2,59 (m, 2H, CH₂ putrescine), 2,50 (dd, 1H, H3'), 1,79 (s, 2H, CH₂ putrescine), 1,62 (m, 2H, CH₂ putrescine)

5 - RMN ³¹P : δ (ppm) : -8,45 (dd, 1P, γP), -13,25 (dd, 1P, αP), -24,20 (t, 1P, βP)

Spectrométrie de masse : MH⁻ = 949,2 g.mol⁻¹

Exemple 4 : Synthèse de la 4-(carboxyméthyl)-2-(thymidin-
10 9-yl)-6-(hydroxyméthyl)morpholine-6-triphosphate
(morpholinoT glycine).

Ce composé répond à la formule (I) avec R¹ représentant la thymine et R² représentant le groupe -CH₂-COOH.

15 Dans cet exemple, on prépare tout d'abord le morpholino-nucléoside, puis on le transforme en triphosphate.

20 a) Préparation du morpholino-nucléoside de la ribothymidine.

Toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un ballon de 250 mL.

25 La ribothymidine (3,500 g, 13,5 mmol, 1 éq) est dissoute dans 35 mL d'eau, puis est additionnée de 1 éq. de periodate de sodium (2,900 g, 13,5 mmol). La solution est alors agitée pendant 45 minutes.

30 La glycine (5,089 g, 67,8 mmol, 5 éq) dans 35 mL d'eau (pH = 9,5-10) est ajoutée et le pH de la solution est remonté à 9,5-10 avec du carbonate de

potassium. La solution est agitée pendant une heure et 45 minutes. Le mélange réactionnel jaunit.

Un sixième de borohydrure de sodium (au total 1,280 g, 33,8 mmol, 2,5 éq) dissous dans 3,5 mL d'eau est
5 ajouté à la solution. On note un dégagement gazeux. Les autres sixièmes, chacun dissous juste avant ajout, sont additionnés toutes les heures.

Après une nuit, la solution est neutralisée par ajout d'acide formique 1M jusqu'à pH4-5, puis elle
10 est évaporée.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur colonne Merck LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5µm, 125x4 mm), avec un débit de 1 mL/min, en utilisant comme éluant : TEAA
15 25mM/MeOH [99/1], indique un rendement de 32% ($k'=8,83$).

Purification : elle est faite par chromatographie "flash" sur une colonne de silice à polarité de phase inversée C-18 (Matrex, Amicon). L'éluant est de l'eau.

20

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 7,77 (s, 1H, H6), 5,92 (dd, 1H, H1'), 4,07 (m, 1H, H4'), 3,77 (m, 2H, H5', H5''), 3,22 (s, 2H, CH₂ glycine), 3,13 (dd, 1H, H2''), 2,99 (dd, 1H, H3''), 2,51 (t, 1H, H2'), 2,34 (t, 1H, H3'), 1,98 (s, 3H, CH₃ base)
25

b) Préparation du morpholino-nucléoside monophosphate de la ribothymidine

30

A 342 mg d'imidazole (5,0 mmol, 3 éq) séchés au dessiccateur puis repris dans 5 mL de pyridine rigoureusement anhydre, sont additionnés 234 µL

d'oxychlorure trichlorure de phosphore (2,5 mmol, 1,5 éq.). Le mélange est placé sous agitation pendant 30 minutes sous air sec.

Parallèlement, 500 mg de la
5 morpholinothymidine (1,7 mmol, 1 éq.) obtenue en a) sont séchés 3 fois dans la pyridine, puis repris dans 5 mL de pyridine anhydre.

Le mélange imidazole/ POCl_3 /pyridine sous argon est additionné à la solution de morpholinonucléoside et
10 l'ensemble est placé sous agitation pendant 48 heures à température ambiante. Puis 100 μL d'eau sont ajoutés en prenant soin de refroidir le ballon réactionnel dans un bain de glace. Le mélange réactionnel est évaporé à sec puis repris 2 fois avec de l'eau et évaporé afin
15 d'éliminer la pyridine.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur colonne Macherey Nagel Nucléosil 5 C-18 (7 μm , 120x3 mm), à un débit de : 1 mL/min, en utilisant comme éluant : TEAA 25mM-MeOH [97/3], indique
20 un rendement de 33% ($k'=0,62$).

Purification : elle est faite par HPLC préparative sur H : colonne Macherey Nagel Nucléosil 7 C-18 (7 μm , 250x21 mm) à un débit de 5 mL/min en utilisant l'eau
25 comme éluant.

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 7,80 (s, 1H, H6), 5,95 (dd, 1H, H1'), 4,19(m, 1H, H4'), 3,94 (t, 2H, H5', H5''),
30 3,28 (s, 2H, CH_2 glycine), 3,24 (m, 1H, H2''), 3,10 (m, 1H, H3''), 2,53 (t, 1H, H2'), 2,39 (t, 1H, H3'), 2,00 (s, 3H, CH_3 base)

- RMN ^{31}P : δ (ppm) : 1,74 (s)

c) Préparation du morpholino-nucléoside triphosphate de la ribothymidine.

5 1,097 g de carbonyldiimidazole (6,7 mmol, 5 équ.) dissous dans 5 mL de diméthylformamide anhydre sont additionnés au sel de tributylammonium du morpholinonucléoside monophosphate de la thymine obtenue en b) (511 mg, 1,3 mmol, 1 équ.) dissous dans 3 mL de
10 diméthylformamide anhydre. Le mélange est placé sous agitation à température ambiante pendant cinq heures. L'excès de carbonyldiimidazole est détruit par ajout de 436 μL de méthanol (10,8 mmol, 8 équ.). Après 30 minutes, 5 équivalents de pyrophosphate de tributylammonium
15 (3,008 g, 6,7 mmol) en solution dans 5 mL de diméthylformamide sont ajoutés. Le mélange est placé sous agitation pendant deux jours, puis le mélange réactionnel est filtré et évaporé à sec.

20 Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée est effectué sur une colonne SFCC PVDI 31 (5 μm , 100x4,6 mm), à un débit de 1 mL/min, en utilisant comme éluant un gradient de formiate d'ammonium (FA), dans les conditions suivantes :

t(min)	FA 25 mM (%)	FA 0,9 M (%)
0	100	0
10	100	0
40	0	100
41	0	100
43	100	0

Ceci indique un rendement de 27% ($k'=13,84$).

Purification : elle est faite par chromatographie "flash" sur une colonne de phase échangeuse d'ions (DEAE Sepharose Fast Flow, Pharmacia Biotech). L'éluant est un gradient de TEAB (de 25 mM à 0,9 M).

5

Caractérisation :

- RMN ^1H : δ (ppm) : 7,74 (s, 1H, H6), 5,92 (dd, 1H, H1'), 4,25 (m, 1H, H4'), 4,15 (m, 2H, H5', H5''), 3,81 (s, 2H, CH₂ glycine), 3,54 (d, 1H, H2''), 3,10 (t, 1H, H3''), 2,56 (t, 1H, H2'), 2,45 (t, 1H, H3'), 1,95 (s, 3H, CH₃ base)

10

- RMN ^{31}P : δ (ppm) : -10,03 (d, 1P, γP), -10,88 (d, 1P, αP), -22,65 (t, 1P, βP)

- Spectrométrie de masse : $\text{MH}^+ = 554,48 \text{ g.mol}^{-1}$

15

Exemple 5 : Utilisation du morpholino T glycine pour l'analyse d'une séquence d'ADN.

On teste le morpholino T glycine de l'exemple 4 en réaction de séquence avec des amorces fluorescentes (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) sur une matrice standard qui est un ADN plasmidique Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA). L'enzyme utilisée est une Taq Polymérase (Perkin-Elmer) que l'on utilise dans son tampon (tampon TACS, Perkin-Elmer).

25

On effectue deux réactions avec le morpholino T glycine à 200 et 500 μM (tableau 4), ainsi que deux réactions témoins (tableau 5) avec le didésoxynucléotide T (Boehringer).

Le milieu réactionnel d'un volume total de 10 μL contient 125 ng de matrice, 1,25 pmoles d'amorce

30

fluorescente et les autres constituants donnés dans les tableaux 4 et 5. Le milieu est soumis à des cycles thermiques afin de réaliser en nombre des molécules de brins d'ADN néoformés. Une amplification sur un appareil
 5 Perkin-Elmer 9700 est réalisée, selon les séquences suivantes : 3 min., 95°C ; 15 cycles (15 sec., 95°C ; 15 sec., 55°C ; 1 min., 70°C) ; 15 cycles (15 sec., 95°C ; 1 min., 70°C). Le produit d'amplification est purifié sur colonne de Sephadex G50.

10 La migration du produit d'amplification obtenu dans l'éluat de colonne est faite en gel dénaturant (urée 7M) d'acrylamide de type Long Ranger (6%), en TBE 1X, sur un appareil Applied Biosystems 377. L'électrophorèse se déroule pendant 12 heures sous 1500 V.

15 La préparation de la solution stock de nucléotides représentant ici un mélange des quatre nucléosides triphosphates naturels, appauvri en thymidine triphosphate (appelé dTTP mix) est effectuée de la façon suivante.

20 On mélange 2µL d'une solution 1,25 mM de dTTP (Promega) avec 2µL de dATP 5 mM (Promega), 2µL de dCTP 5 mM (Promega) et 2 µL de dGTP 5 mM (Promega).

Tableau 4

	Morpholino T glycine 200 µM	Morpholino T glycine 500 µM
Tampon TACS (x5)	2 µL	2 µL
Z1M13 Primer (JOE)	1 µL	1 µL
DTTP mix	1 µL	1 µL
Morpholino T glycine 2 mM	1 µL	2,5 µL
Taq (3U/µL)	1 µL	1 µL
Matrice	1 µL	1 µL
H ₂ O	3 µL	1,5 µL

Tableau 5

	ddTTP 250 μ M	ddTTP 300 μ M
Tampon TACS (x5)	2 μ L	2 μ L
Z1M13 Primer (ROX)	1 μ L	1 μ L
DTTP mix	1 μ L	1 μ L
DdTTP 2,5 mM	1 μ L	2,5 μ L
Taq (3U/ μ L)	1 μ L	1 μ L
Matrice	1 μ L	1 μ L
H ₂ O	3 μ L	1,5 μ L

On détecte les produits des réactions de séquence par fluorescence. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure annexée qui illustre la détection des produits dans le gel de séquençage analysés par le logiciel Perkin Elmer Analysis, version 3.0.

Pour chaque essai, les primers sont identifiables par leurs propriétés de fluorescence, le marqueur ROX (rouge) pour la réaction de contrôle avec le didésoxythymidine triphosphate 250 μ M (courbe en tirets) et le marqueur JOE (vert) pour la réaction concernant la morpholino T glycine 200 μ M (courbe en trait plein).

Comme le montre la figure, les résultats de ces tests sont tout à fait concluants puisque le morpholino T glycine est bien incorporé de manière base spécifique par la Taq Polymérase, et agit bien comme un terminateur de chaîne.

Les trois autres morpholino-nucléotides peuvent être employés de la même manière pour déterminer les positions des quatre bases de l'ADN dans le fragment à analyser.

Exemple 6 : Test des morpholino A putrescine et morpholino A fluorescéine en séquençage

On teste les morpholino A putrescine (MATPP) et morpholino A fluorescéine (MATPPF) en réaction de séquence avec des amorces fluorescentes (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) sur une matrice standard qui est un ADN plasmidique Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA). L'enzyme utilisée est une Taq Polymérase (Perkin-Elmer) que l'on utilise dans son tampon (tampon Thermo Sequenase, Amersham, Life Science).

On effectue trois réactions de séquence avec le MATPP à 100, 200 et 400 μM et quatre réactions de séquence avec le MATPPF à 200, 500, 1000 et 5000 μM , ainsi que des réactions témoins avec le didésoxynucléotide ddATP à la concentration de 250 μM (Boehringer).

Le milieu réactionnel d'un volume total de 10 μL contient 125 ng de matrice, 1,25 pmoles d'amorce fluorescente et les autres constituants tel que décrit dans les tableaux.

Le milieu est soumis à des cycles thermiques afin de réaliser en nombre des molécules de brins d'ADN néoformés. Une amplification sur un appareil Perkin-Elmer 9700 (Gene Amp[®], PCR System 9700) est réalisée, selon les séquences suivantes :

MATPP 3 min, 95°C ; 30 cycles (15 sec., 95°C ; 15 sec., 55°C ; 1 min, 70°C)

MATPPF 3 min, 95°C ; 30 cycles (15 sec., 95°C ; 15 sec., 55°C ; 4 min, 60°C)

Les produits d'amplification sont purifiés sur colonne de Sephadex G50. Les produits de chaque réaction de séquence sont mélangés aux produits d'une réaction témoin et analysés par électrophorèse.

La migration du mélange obtenu est faite en gel dénaturant (urée 7M) d'acrylamide de type Long Ranger (6%), en TBE 1X, sur un appareil Applied Biosystems 377 (ABI Prism DNA Sequencer, Perkin Elmer).
5 L'électrophorèse se déroule pendant 7 heures sous 1680 V, 50 mA.

Préparation de la solution stock de nucléotides : dATP mix pour 16 réactions

10 représentant ici un mélange des quatre nucléotides triphosphates naturels, appauvri en désoxyadénosine triphosphate (appelé dATP mix) : on mélange 4 μ L d'une solution 1,25 mM de dATP (Promega) avec 4 μ L de dTTP 5 mM (Promega), 4 μ L de dCTP 5 mM (Promega) 4 μ L de dGTP 5 mM (Promega).

Tableau 6

Préparation du Mix commun pour 15 réactions

	/réaction	/15 réactions
Tampon TACS (x5)	2 μ L	30 μ L
dATP mix	1 μ L	15 μ L
Taq (5U/ μ L)	1 μ L	15 μ L
Matrice (plasmide Bluescript)	2 μ L	30 μ L

- 5 Préparation de la solution mère 2mM de MATPP :
 (1,17 mg de MATPP est dilué dans 1,04 ml d'H₂O.

Tableau 7

Réactions avec la morpholino ATPP 2mM

10

	Morpholino ATPP 400 μ M	Morpholino ATTP 200 μ M	Morpholino ATTP 100 μ M
Mix commun	6 μ L	6 μ L	6 μ L
Z1M13 Primer (JOE)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Morpholino ATPP 2 mM	2 μ L	1 μ L	0,5 μ L
H ₂ O	1 μ L	2 μ L	2,5 μ L

Tableau 8

Trois réactions de contrôle avec le didésoxyadénosine triphosphate (ddATP) 2,5 mM

	DdATP 250 μ M
Mix commun	6 μ L
Z1M13 Primer (ROX)	1 μ L
DdATP 2,5 mM	1 μ L
H ₂ O	2 μ L

Préparation des solutions mères 20 mM et 2mM de MATPPF

Solution S₀ à 20 mM : diluer l'échantillon (2,2 mg) dans 110,5 μ L d'H₂O

Solution S₁ à 2 mM : prélever 10 μ L de S₀ et rajouter 90 μ L d'H₂O

Tableau 9

Réactions avec la morpholino ATPPF 20 mM (S₀)

	MATPPF 1000 μ M	MATPPF 5000 μ M
Mix commun	6 μ L	6 μ L
Z1M13 Primer (JOE)	1 μ L	1 μ L
Morpholino ATPPF 20 mM	0,5 μ L	2,5 μ L
H ₂ O	2,5 μ L	0,5 μ L

Tableau 10

Réactions avec la morpholino ATPPF 2 mM (S₁)

	MATPPF 500 μ M	MATTPF 200 μ M
Mix commun	6 μ L	6 μ L
Z1M13 Primer (JOE)	1 μ L	1 μ L
Morpholino ATPPF 2 mM	2,5 μ L	1 μ L
H ₂ O	0,5 μ L	2 μ L

5

Tableau 11

Quatre réactions de contrôle avec le didésoxyadénosine triphosphate (ddATP) 2,5 mM

	ddATP 250 μ M
Mix commun	6 μ L
Z1M13 Primer (ROX)	1 μ L
ddATP 2,5 mM	1 μ L
H ₂ O	2 μ L

10

On donne sur la figure 2 les résultats obtenus avec le morpholino A putrescine à 100 μ M et le morpholino A fluorescéine à 5 mM, entre la 90^{ème} et la 250^{ème} base.

On constate donc que ces deux dérivés agissent bien comme des terminateurs de chaîne. De plus, il est à noter que les réactions effectuées avec le dérivé fluorescent, le morpholino A fluorescéine, ont été détectées par le fluorophore porté par ce dérivé : on a donc préparé un terminateur de chaîne fluorescent.

20

Exemple 7 : Utilisation des morpholino A putrescine (MATPP) et morpholino A fluorescéine (MATPPF) pour le marquage matrice-dépendant de fragments d'ADN en 3' ; test de l'incorporation enzymatique de ces composés par
 5 trois polymérases (Taq, Klenow, Klenow Exo Free) et une transcriptase inverse.

Ces deux dérivés de nucléosides triphosphates sont testés en incorporation enzymatique pour marquer un oligonucléotide de 13 bases de long en son extrémité 3'.
 10 Ce marquage est dit "matrice dépendant" car les enzymes utilisées ont besoin de la cible complémentaire pour allonger l'oligonucléotide selon les règles de Watson & Crick. La séquence A (17870 pmol/mL) étudiée ainsi que sa cible C (16128 pmol/mL) sont données dans la figure ci-
 15 dessous :

Cible C :	3'-TGC CAA CCA ACC CCA CCT CAA CCT CTG-5'
Amorce A :	5'-ACG GTT GGT TGG G (13 bp)
Fragments attendus :	5'-ACG GTT TGG GGT GGA (18 bp)
20 et longueurs (bp)	5'-ACG GTT GGT TGG GGT GGA GTT GGA (24 bp)
	5'-ACG GTT GGT TGG GGT GGA GTT GGA GA (26 bp)
	5'-ACG GTT GGT TGG GGT GGA GTT GGA GAC (27 bp)

Trois enzymes sont utilisées pour ce marquage :
 25 la Taq DNA polymérase (Boehringer Mannheim), la Klenow (Boehringer Mannheim) et la Klenow Exonuclease Free (Amersham Life Science). L'amorce est marquée en son extrémité 5' par incorporation de ³²P phosphate avec le kit "Ready to go" T4 Polynucléotide Kinase (Pharmacia
 30 Biotech). L'amorce radiomarkée est notée A*.

On prépare les tampons de réaction des trois enzymes pour 10 réactions :

Tableau 12

(en μL)	Réaction Taq	Réaction Klenow Exo Free
C	50	50
A	10	10
A*	10	10
Tp 10X	50	50
H ₂ O	50	50

Tableau 13

5

(en μL)	Réaction Klenow
C	50
A	10
A*	10
Tp 5X	100
H ₂ O	0

Les enzymes sont ensuite diluées de la façon suivante, pour 10 réactions :

- 10 - Taq (5U/ μL) : 10X0,1 μL de Taq + 10X15,5 μL d'H₂O
 - Klenow (20U/ μL) : 10X0,1 μL de Klenow + 10X15,5 μL d'H₂O
 - Klenow Exo Free (5U/ μL) : 10X0,1 μL de Klenow Exo Free + 10X15,5 μL d'H₂O.

On prépare également des solutions contenant les nucléosides triphosphates normaux :

- 15 - Solution "2P" composée d'un mélange de dGTP et dTTP à 0,1 mM chacun
 - Solution "4P" composée d'un mélange de dATP, dCTP, dGTP et dTTP à 0,1 mM chacun

20 Les réactions de mises en œuvres sont décrites dans le tableau 14 suivant :

Tableau 14

(en μ L)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		400 μ M	200 μ M	50 μ M	2,5 mM	400 μ M	200 μ M	50 μ M	
Réaction	17	17	17	17	17	17	17	17	17
"2P"	0	5	5	5	5	5	5	5	0
"4P"	0	0	0	0	0	0	0	0	5
MATPP 2 mM	0	10	5	1,25	0	0	0	0	0
MATPPF 20 mM	0	0	0	0	6,25	0	0	0	0
MATPPF 2mM	0	0	0	0	0	10	5	1,25	0
H ₂ O	33	2,7	7,4	11,15	6,15	2,4	7,4	11,15	12,4
Enzyme	0	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6

Le morpholino A putrescine est ainsi testé à trois concentrations : 400, 200 et 50 μ M tandis que le morpholino A fluorescéine est mis en réaction à 2,5 mM, 400, 200 et 50 μ M.

5 Avant l'ajout de l'enzyme, le mélange est dénaturé à 94°C pendant 5 minutes. Puis on laisse revenir à température ambiante afin que l'hybridation ait lieu. L'élongation est effectuée à 70°C pour la Taq, 37°C pour les deux Klenow, et ce pendant
10 10 minutes. Enfin, le milieu est à nouveau dénaturé par une solution de formamide et chauffage à 90 °C pendant 5 minutes avant d'être déposé sur un gel de polyacrylamide. La séparation est effectuée par électrophorèse à 2000 V. La lecture du gel est faite au
15 Phosphorimager ; les résultats obtenus sont montrés sur la figure 3.

Sur cette figure, les pistes numéro 1 servent de contrôle de migration de l'oligonucléotide A marqué. Cet oligonucléotide a une longueur de 13 bases
20 (13-mer). Les pistes 2, 3 et 4 permettent de suivre l'allongement de l'oligonucléotide A et l'incorporation du morpholino A putrescine. Dans ces conditions, seuls les nucléotides dGTP et dTTP (solution "2P") ont été ajoutés et sont utilisables par l'enzyme pour procéder
25 à l'extension de l'amorce. La présence du morpholino A putrescine dans le milieu réactionnel permet son incorporation au niveau de la base 18. Un témoin a été effectué, en ne mettant dans le milieu que le mélange "2P" ; dans ce cas, l'enzyme poursuit son extension
30 jusqu'à la 17^{ème} base puisqu'elle n'a pas de dérivé de l'adénosine pour continuer sa polymérisation. Ainsi, la différence de migration entre ce témoin, long de 17 bases, et les réactions 2, 3 et 4 confirme

l'incorporation du MATPP et l'interruption de l'élongation de la chaîne. Les réactions 5 à 8 correspondent aux mêmes réactions avec le morpholino A fluorescéine. Là encore, le MATPPF est bien incorporé et arrête la polymérisation du brin complémentaire. On note toutefois pour les deux Klenow, qu'il y a eu parfois incorporation d'une autre base (G ou T) à la place du dérivé morpholino. En effet, on trouve dans ces cas des produits d'élongation, correspondant aux 18- et 24-mer.

Le puits 9 (voir figure 4) est une réaction de contrôle : le milieu réactionnel contient les 4 désoxynucléotides normaux et peut de ce fait allonger l'amorce jusqu'à son extension maximale, c'est-à-dire jusqu'à obtention du 27-mer.

En conclusion, les trois enzymes incorporent le morpholino A putrescine et le morpholino A fluorescéine dans toutes les concentrations testées, y compris aux plus faibles concentrations.

La capacité des transcriptases inverses à incorporer les dérivés morpholinonucléotides au cours de l'extension d'oligonucléotides a été confirmée. Dans ce test, la transcriptase inverse (M-MLV, Promega ; activité : 200 000 U/mL) est choisie comme modèle. Cette dernière est capable de synthétiser un brin d'ADN complémentaire d'une cible (ADN ou ARN), à partir d'une amorce oligonucléotide, en présence de nucléosides triphosphates. On teste donc les morpholino A putrescine et morpholino A fluorescéine à des concentrations finales de 250 μ M. Une copie de contrôle est aussi déposée sur le gel, avec les quatre nucléosides triphosphates de la solution "4P".

La séquence de la cible C (27-mer, 16128 pmol/mL) est celle de l'amorce B (14-mer, 56368 pmol/mL) sont montrées ci-dessous. Cette amorce B, marquée de façon radioactive est notée B*.

- 5 La solution B* contient alors 10 pmol de l'amorce B dans un volume de 50 µL. On dilue également les solutions de C et B dix fois ; ces solutions sont notées respectivement C/10 et B/10.

- 10 Cible C : 3'-TGC CAA CCA ACC CCA CCT CAA CCT CTG-5'
Amorce B : 5'-ACG GTT GGT TGG GG (14 bp)

Tableau 15

15

(en µL)	Réaction 1	Réaction 2	Réaction 3	Réaction 4
C/10	2	2	2	0
B*	5	5	5	5
B/10	3	3	3	0
Tampon 5X	4	4	4	0
MATPP 2 mM	2,5	0	0	0
MATPPF 2 mM	0	2,5	0	0
"2P"	2,5	2,5	0	0
"4P"	0	0	2,5	0
H ₂ O	0	0	0	15
Enzyme	1	1	1	0

- Comme précédemment, le mélange est dénaturé, avant l'ajout de l'enzyme, à 94°C pendant 5 minutes et on laisse revenir à température ambiante.
- 20 L'élongation se fait à 37°C pendant 60 minutes. Le milieu est dénaturé par une solution de formamide et chauffage à 90 °C pendant 5 minutes avant d'être déposé sur un gel de polyacrylamide. La séparation se fait par électrophorèse à 1500 V. La lecture du gel est faite au

Phosphorimager ; les résultats obtenus sont donnés sur la figure 4.

Sur cette figure, la piste 4 permet d'estimer la longueur de l'amorce B marquée. La piste 3 montre l'allongement maximal de l'amorce B jusqu'à un produit final de 27 paires de bases en présence des 4 désoxynucléotides naturels. Les réactions 1 et 2 montrent que les dérivés morpholino sont incorporés au cours de l'élongation de l'amorce B par la transcriptase inverse. Cette incorporation est quantitative et fournit un produit de 18 paires de bases (en absence de dérivé morpholino, l'extension est bloquée à la 17^{ème} base).

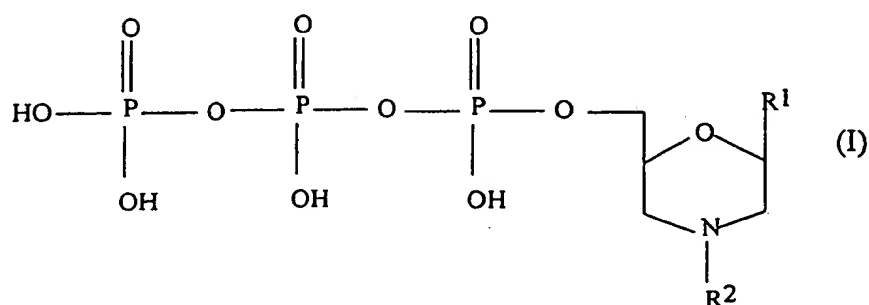
En conclusion, les dérivés morpholino sont très bien reconnus par la transcriptase inverse et incorporés dans les amorces en cours d'allongement selon un processus base spécifique.

Références citées

- [1] : Sanger et al, Proceedings of National Academy of Science, 74, 1977, p. 5463-5467.
- [2] : WO-A-96/23807.
- [3] : Prober et al, Science, 238, 1987, pages 336-341.
- [4] : Hileman et al, Bioconjugate Chemistry, 5, 1994, pages 436-444.
- [5] : Broker et al, Nucleic Acids Research, 5, 1978, pages 363-385.
- [6] : Agrawal et al, Nucleic Acids Research, 14, 1986, pages 6227-6245.
- [7] : FR-A-2 710 068
- [8] : Rayford et al, Journal of Biological Chemistry, 260, 1985, pages 15708-15713.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de fabrication d'un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) marqué en 3', qui comprend l'incorporation enzymatique d'un dérivé de nucléotide ayant pour précurseur un composé de formule :

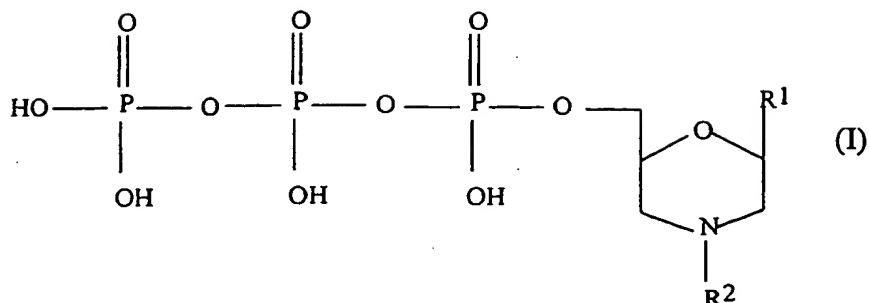


- 10 dans laquelle R^1 représente une base nucléique et R^2 représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

- | | | |
|----|---|--------------------------------|
| | $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ | $-(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$ |
| | $-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ | $-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ |
| 15 | $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{R}^3$ | $-(\text{CH}_2)_n-\text{SR}^3$ |
| | $-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{R}^3$ | $-(\text{CH}_2)_n-\text{OR}^3$ |

- 20 dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R^3 est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide, à l'extrémité 3' OH du fragment d'acide nucléique.

2. Procédé de modification d'un fragment d'acide nucléique par incorporation enzymatique en 3' d'un morpholino-nucléotide modifié ayant pour précurseur un composé répondant à la formule :

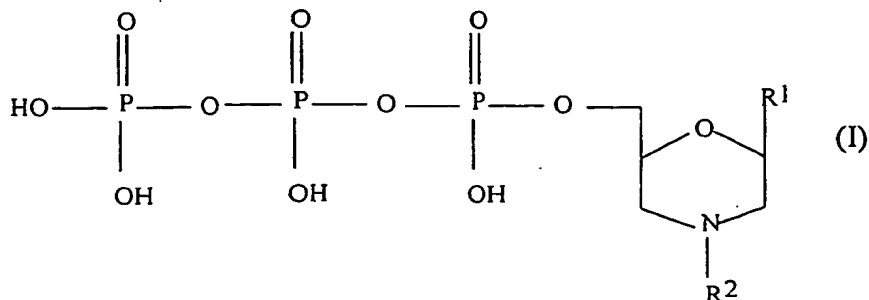


dans laquelle R^1 représente une base nucléique et R^2 représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

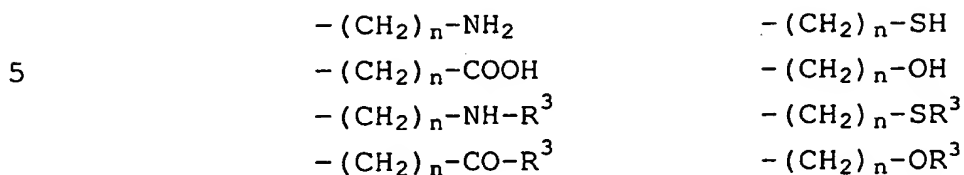
- 5
- $(\text{CH}_2)_n\text{-NH-R}^3$
 - $(\text{CH}_2)_n\text{-CO-R}^3$
 - $(\text{CH}_2)_n\text{-SR}^3$
 - $(\text{CH}_2)_n\text{-OR}^3$

10 dans lesquelles R^3 représente un composé choisi parmi les photoréticulants, les acides gras, les peptides hydrophobes, les anticorps, les enzymes et les fluorophores.

- 15 3. Procédé de séquençage d'un acide nucléique (ADN ou ARN) par la technique de polymérisation enzymatique de la séquence complémentaire de cet acide nucléique en utilisant des terminateurs de chaînes, dans lequel au moins l'un des terminateurs de chaînes a pour précurseur un composé
- 20 répondant à la formule :



dans laquelle R^1 représente une base nucléique et R^2 représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :



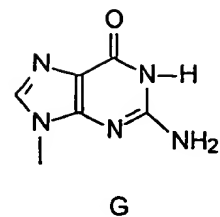
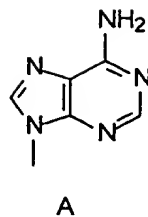
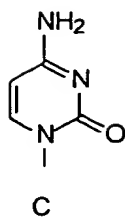
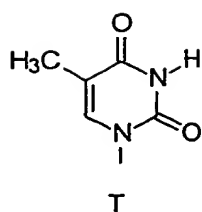
dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R^3 est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide.

4. Procédé selon la revendication 1, 2 ou 3, dans lequel l'enzyme est le fragment de Klenow de l'ADN polymérase.

5. Procédé selon la revendication 1, 2 ou 3, dans lequel l'enzyme est une polymérase thermorésistante d'une bactérie Thermophile ou la terminale transférase ou la transcriptase inverse.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la base nucléique est une base nucléique naturelle choisie parmi l'adénine, la guanine, la cytosine, la thymine, l'uracile, la xanthine, l'hypoxanthine, la 2-aminopurine et leurs dérivés.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel R^1 répond à l'une de formules suivantes :



8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le marqueur est
 5 choisi parmi les produits radioactifs, les produits luminescents, électroluminescents et fluorescents, les molécules capables de se coupler à d'autres molécules, les molécules autorisant des interactions du type antigène-anticorps, et les marqueurs enzymatiques.

10

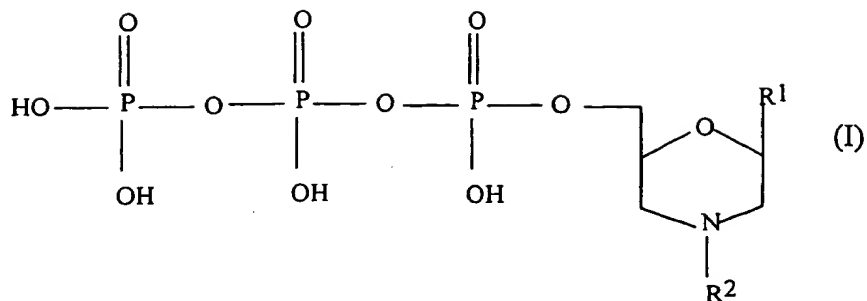
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel R^3 est un fluorophore.

15

10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel R^3 est choisi parmi les dérivés de la fluorescéine, de la biotine et de la rhodamine.

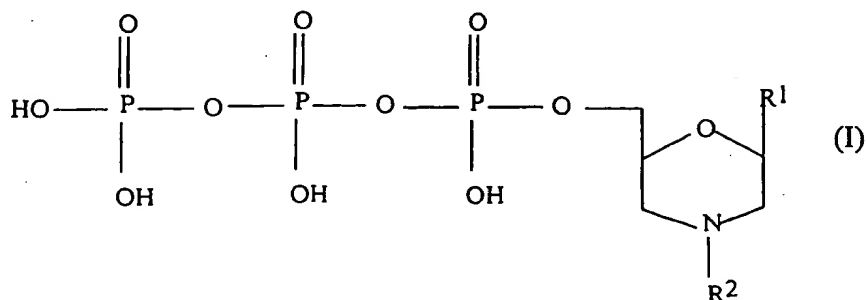
11. Procédé selon la revendication 1, 2 ou
 20 3 dans lequel le dérivé, le morpholino-nucléotide modifié, ou le terminateur de chaîne est le composé (I) sous forme de monophosphate.

12. Morpholino-nucléotide répondant à la
 25 formule :



5 dans laquelle R^1 est l'adénine et R^2 représente $-\text{CH}_2-\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ ou $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{R}^3$ avec R^3 représentant un groupe dérivé de la fluorescéine.

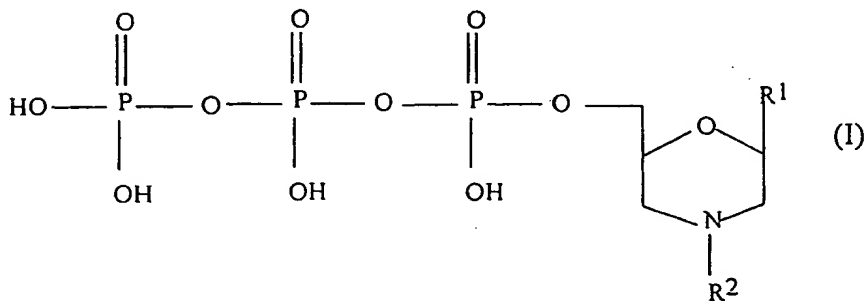
13. Morpholino-nucléotide de formule :



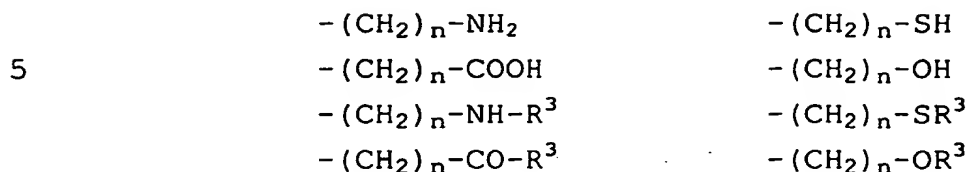
10 dans laquelle R^1 est la thymine et R^2 représente $-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

14. Procédé de fabrication d'un morpholino-nucléotide de formule :

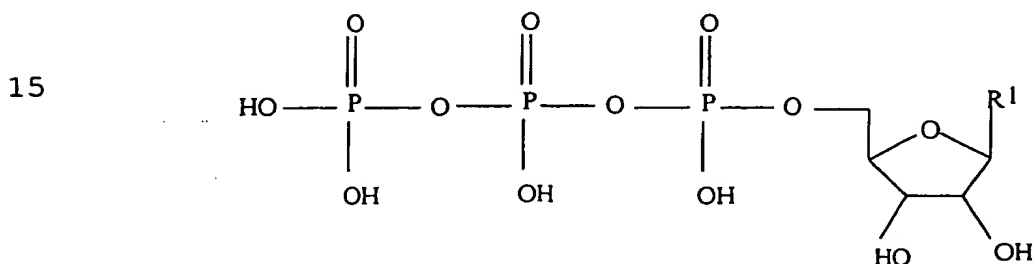
15



dans laquelle R^1 représente une base nucléique et R^2 représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :

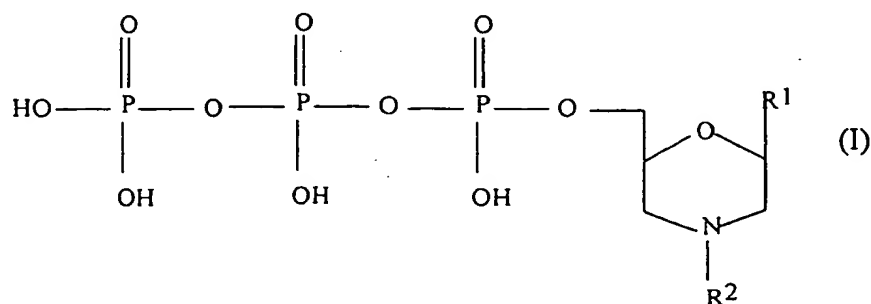


dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R^3 est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide, la réaction d'un nucléoside triphosphate de formule :

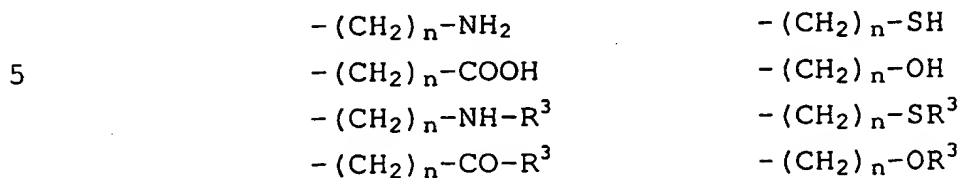


20 dans laquelle R^1 a la signification donnée ci-dessus, avec un periodate, un composé de formule $R^2 NH_2$ dans laquelle R^2 a la signification donnée ci-dessus et du borohydrure de sodium.

25 15. Utilisation d'un morpholino-nucléotide de formule :



dans laquelle R^1 représente une base nucléique et R^2 représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :



10 dans lesquelles n est un nombre entier allant de 1 à 12 et R^3 est un groupe dérivé d'un marqueur, d'une protéine, d'une enzyme, d'un acide gras ou d'un peptide, pour le marquage de fragments d'ADN ou d'ARN.

L'invention concerne également l'utilisation d'un dérivé de nucléotide ayant pour précurseur un composé de formule (I) pour le marquage en 3' de fragments d'acide nucléique (ADN ou ARN) par incorporation enzymatique du dérivé de nucléotide à l'extrémité 3'OH du fragment d'acide nucléique.

L'enzyme utilisée peut être le fragment de Klenow de l'ADN polymérase, et on utilise alors une matrice ou template pour fixer le morpholino-nucléoside sur le fragment d'acide nucléique qui sert d'amorce.

L'enzyme utilisée peut aussi être une polymérase thermorésistante d'une bactérie thermophile ou la terminal transférase ou la transcriptase inverse.

Les fragments d'ADN ou d'ARN ainsi marqués sont utilisables pour bloquer toute ligation ultérieure et assurer une protection contre les exonucléases, ainsi que pour détecter des fragments d'ADN ou d'ARN.

On peut encore utiliser un morpholino-nucléotide modifié ayant pour précurseur un composé de formule (I) pour modifier un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) par incorporation enzymatique à l'extrémité 3' de celui-ci d'un morpholino-nucléotide modifié ayant pour précurseur un composé de formule (I) comprenant en R³ un composé choisi parmi les photoréticulants par exemple pour réticulation sur ADN ou sur un support quelconque ; les acides gras, les peptides hydrophobes, les anticorps, par exemple pour faciliter la pénétration dans les cellules, les enzymes ou parties d'enzymes telles que les phosphatases alcalines, les peroxydases, les acétylcholinestérases pour la détection, les enzymes de restriction pour le clivage de l'ADN vicinal, et les fluorophores.

Comme précédemment l'incorporation de ce morpholino-nucléotide modifié est effectuée par voie enzymatique. Les bases azotées, les marqueurs et les enzymes utilisables peuvent être les mêmes que ceux précités.

Selon l'invention, le dérivé de nucléotide, le morpholino-nucléotide modifié et le terminateur de chaîne utilisés respectivement pour le marquage en 3' de fragments d'acide nucléique, pour la modification de
5 fragments d'acide nucléique ou pour le séquençage d'un acide nucléique, peuvent être le composé (I) sous forme de monophosphate.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la
10 description qui suit d'exemples de réalisation, donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence au dessin annexé.

Brève description des figures

La figure 1 est un diagramme illustrant les
15 résultats obtenus pour le séquençage d'ADN plasmidique avec le terminateur de chaîne de l'invention (courbe en trait plein) et avec le terminateur de chaîne de l'art antérieur (courbe en tirets).

La figure 2 est un diagramme illustrant les
20 résultats obtenus en testant les morpholino A putrescine (MATPP) et morpholino A fluorescéine (MATPPF) en séquençage.

La figure 3 est un schéma illustrant le
25 résultat sur gel de polyacrylamide d'un test permettant de suivre l'allongement d'un oligonucléotide A et l'incorporation de morpholino A putrescine.

Exposé détaillé des modes de réalisation

Les exemples 1 à 4 qui suivent, illustrent la synthèse de morpholino-nucléotides de formule (I).

Exemple 3 : Synthèse de la 4-[5((2-aminobutyl)-thiouréidyl)fluorescein)]-2-(adénosin-9-yl)-6-(hydroxyméthyl)-morpholine-6-triphosphate (morpholino A putrescine-fluorescéine).

5 Ce composé répond à la formule (I) avec R^1 représentant l'adénine, et R^2 représentant $(CH_2)_4NHR^3$ où R^3 est un groupe dérivé de la fluorescéine.

Toutes les réactions sont conduites à la température ambiante, sous agitation magnétique, dans un
10 ballon de 100 mL.

On ajoute en trois fois et progressivement à 200 mg (0,3 mmol, 1 éq.) de la Morpholino A putrescine de l'exemple 2, dans un mélange eau/pyridine (1/1), 184,9 mg (0,5 mmol, 1,5 éq.) de fluorescéine isothiocyanate. Le
15 milieu est agité pendant 48 heures avant d'être évaporé à sec.

Une analyse par chromatographie en polarité de phase inversée sur la colonne Merck LiChrocart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 ("endcapped", 5 μ m, 125x4 mm), avec
20 un débit de 1 mL/min en utilisant comme éluant : TEAA 25mM/MeOH [97/3], indique un rendement d'environ 48% ($k'=7,51$).

Purification : elle est faite par chromatographie "flash"
25 sur une colonne de silice à polarité de phase inversée C-18 (Econosil prep 90, Alltech, France). L'éluant est un gradient eau/MeOH.

Caractérisation :

30 - RMN 1H : δ (ppm) : 8,57 (s, 1H, H2), 8,31 (s, 1H, H8), 8,20-6,65 (9H, fluorescéine), 5,79 (dd, 1H, H1'), 4,25(m, 1H, H4'), 4,11 (m, 2H, H5', H5''), 3,60 (s,

L'invention concerne également l'utilisation d'un dérivé de nucléotide ayant pour précurseur un composé de formule (I) pour le marquage en 3' de fragments d'acide nucléique (ADN ou ARN) par incorporation enzymatique du dérivé de nucléotide à l'extrémité 3'OH du fragment d'acide nucléique.

Elle concerne aussi le procédé de fabrication d'un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) marqué 3' par incorporation enzymatique du dérivé de nucléotide mentionné ci-dessus à l'extrémité 3'OH du fragment d'acide nucléique.

L'enzyme utilisée peut être le fragment de Klenow de l'ADN polymérase, et on utilise alors une matrice ou template pour fixer le morpholino-nucléoside sur le fragment d'acide nucléique qui sert d'amorce.

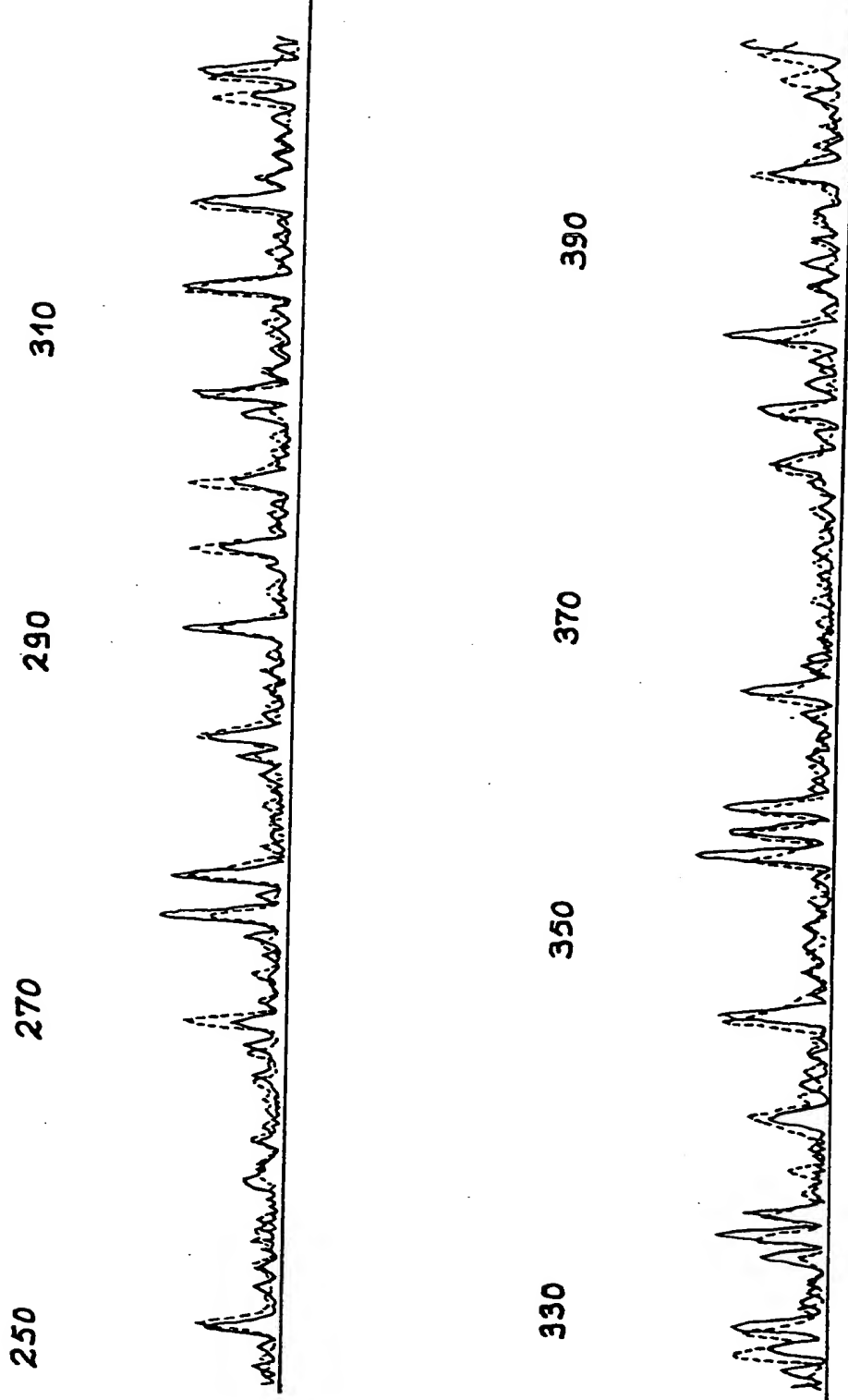
L'enzyme utilisée peut aussi être une polymérase thermorésistante d'une bactérie thermophile ou la terminal transférase ou la transcriptase inverse.

Les fragments d'ADN ou d'ARN ainsi marqués sont utilisables pour bloquer toute ligation ultérieure et assurer une protection contre les exonucléases, ainsi que pour détecter des fragments d'ADN ou d'ARN.

On peut encore utiliser un morpholino-nucléotide modifié ayant pour précurseur un composé de formule (I) pour modifier un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) par incorporation enzymatique à l'extrémité 3' de celui-ci d'un morpholino-nucléotide modifié ayant pour précurseur un composé de formule (I) comprenant en R³ un composé choisi parmi les photoréticulants par exemple pour réticulation sur ADN ou sur un support quelconque ; les acides gras, les peptides hydrophobes, les anticorps, par exemple pour faciliter la pénétration dans les cellules, les enzymes ou parties d'enzymes telles que les phosphatases alcalines, les peroxydases, les acétylcholinestérases pour la détection, les enzymes de restriction pour le clivage de l'ADN vicinal, et les fluorophores.

Comme précédemment l'incorporation de ce morpholino-nucléotide modifié est effectuée par voie enzymatique. Les bases azotées, les marqueurs et les enzymes utilisables peuvent être les mêmes que ceux précités.

FIG. 1



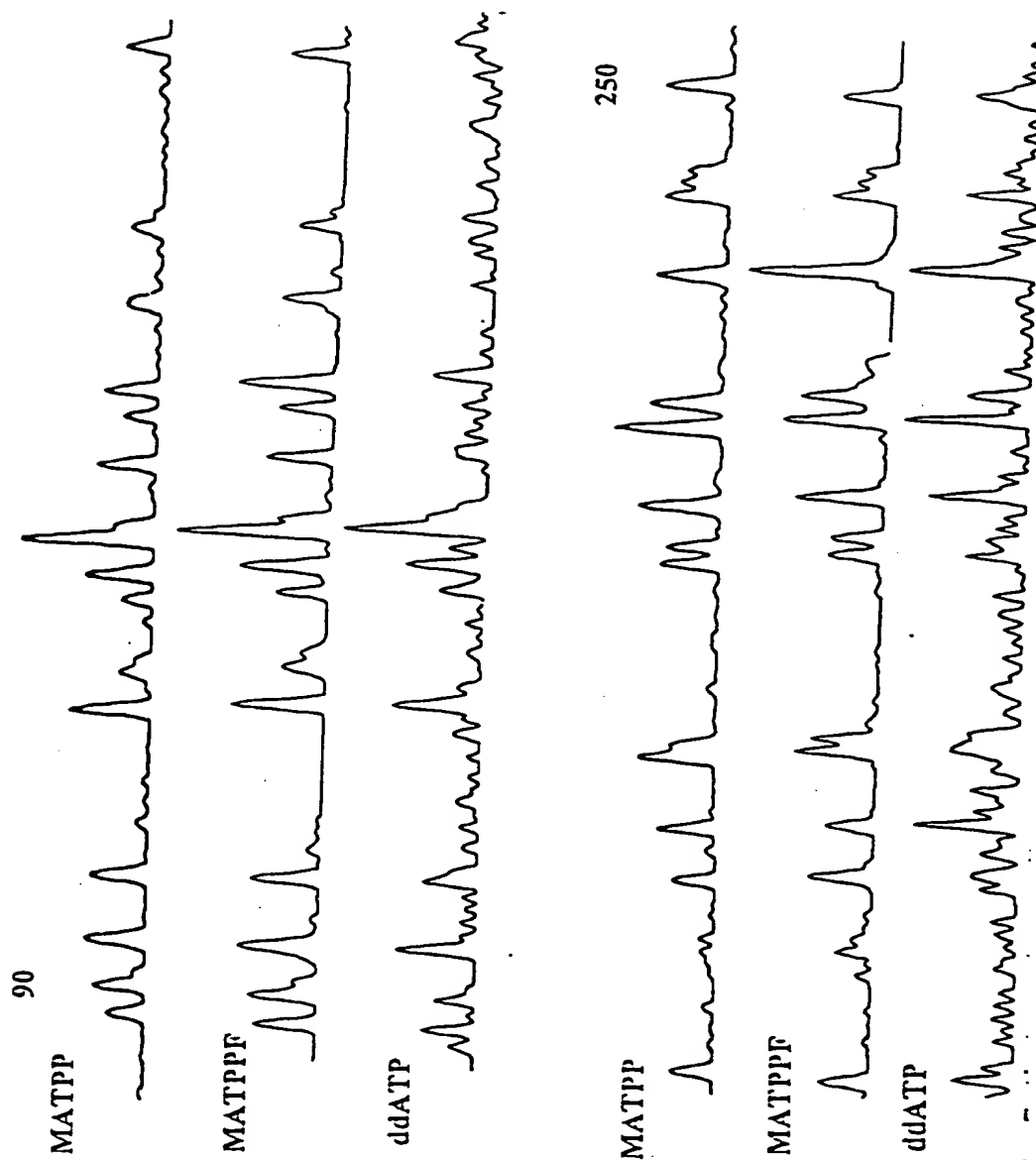


FIG. 2

FIG. 3

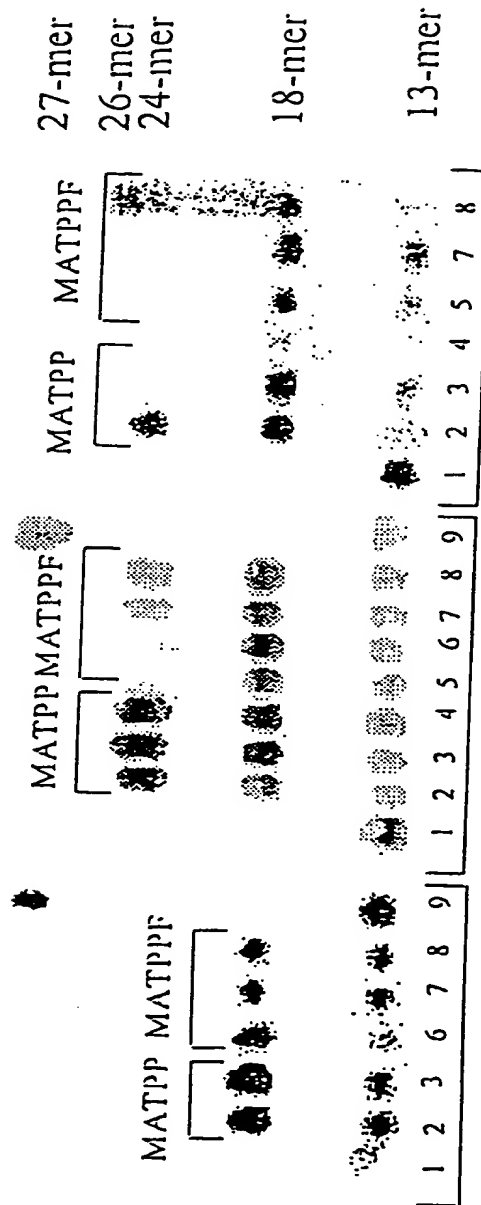
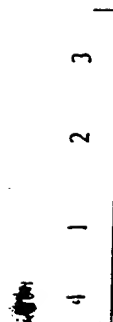


FIG. 4

